

· 论 著 ·

# hVEGF<sub>121</sub>基因转染对人脐静脉内皮细胞生长的作用

李红华, 刘厚奇\*, 汤淑萍, 熊 俊, 汤瑞宝, 胡凯猛

(第二军医大学基础医学部组织胚胎学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的: 构建人血管内皮生长因子(hVEGF)-121的真核细胞复制表达质粒, 将hVEGF<sub>121</sub>基因转染进入脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), 通过旁分泌作用来加快其生长速度。方法: 采用RT-PCR方法, 从人胚胎成纤维细胞中克隆hVEGF<sub>121</sub>前体蛋白全长cDNA, 构建重组真核表达质粒pDNA 3-hVEGF<sub>121</sub>, 用FuGENE 6介导转染入HUVEC。收集转染的HUVEC培养上清, 用ELISA法定量检测hVEGF蛋白的表达情况; 绘制细胞生长曲线, 检测hVEGF<sub>121</sub>促进HUVEC增殖的生物学活性。设转染pDNA 3空质粒载体和不转染任何DNA的HUVEC做对照。结果: (1)成功构建了pDNA 3-hVEGF<sub>121</sub>真核表达质粒, 经测序证明基因序列与GenBank中核酸序列一致, 且插入方向正确; (2)转染细胞瞬时表达hVEGF蛋白, 于转染1d后每10<sup>4</sup>个细胞每天可分泌hVEGF蛋白59.95pg, 约为对照组的100倍, 之后表达水平先快后慢下降, 于转染7d后仍较对照组高近1倍; (3)转染细胞生长速度明显加快, 在转染3d后细胞数与对照组相比即有显著性差异(P < 0.01), 细胞倍增时间从对照组的7d以上缩短为3d左右。结论: 成功构建了pDNA 3-hVEGF<sub>121</sub>真核表达质粒; 该质粒能在HUVEC中表达有生物活性的hVEGF<sub>121</sub>蛋白, 通过旁分泌作用明显促进HUVEC的分裂增殖。

**[关键词]** 血管内皮生长因子-121; 真核表达; 人脐静脉内皮细胞; 细胞增殖

**[中图分类号]** R 813.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)10-1074-04

## Effects of hVEGF<sub>121</sub> gene transfection on human umbilical vein endothelial cells growth

LI Hong-Hua, LIU Hou-Qi\*, TANG Shu-Ping, XIONG Jun, TANG Rui-Bao, HU Kai-Meng (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct human vascular endothelial growth factor (hVEGF)-121 protein expression plasmid, and to transfect it into human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to speed up their growth *in vitro* through a paracrine way. **Methods:** hVEGF<sub>121</sub> cDNA was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from human embryonic fibroblast and was inserted into eukaryotic expression vector pDNA 3. The recombinant plasmid was transfected into HUVEC by FuGENE 6 liposome. The culture supernatant of the transfected cells was collected, and the expression of hVEGF protein was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The role of hVEGF<sub>121</sub> gene transfer in HUVEC proliferation was studied by cell-counting. pDNA 3 vector transfected and non-transfected HUVEC were used as the control groups. **Results:** pDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> plasmid was constructed. After cell transfection, hVEGF protein was transiently expressed and peaked on 1 d at 59.95 pg/(10<sup>4</sup> cells · d), about 100 times that of the control group level; afterwards, the productions decreased quickly and then slowly, but still about 1 time higher than that of the control group level on 7 d. The transfected HUVEC proliferated more rapidly than that of the control groups on 3 d (P < 0.01), with the cell doubling time shortened to about 3 d from over 7 d in the control group. **Conclusion:** Plasmid pDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> has been constructed successfully, which can express active hVEGF<sub>121</sub> protein in HUVEC cultured *in vitro*, thus promoting HUVEC proliferation by a paracrine loop.

**[KEY WORDS]** human vascular endothelial growth factor-121; eukaryotic expression; human umbilical vein endothelial cells; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(10): 1074-1077]

\* 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)是生物医学研究中的常用体外细胞实验模型, 还是血管组织工程领域中重要的种子细胞, 用于使人工血管内皮化以减少血栓形成, 提高血管通畅率<sup>[1]</sup>。但是, HUVEC体外增殖速度慢且容易老化, 难以满足基础和临床研究的需要。为解决这一问题, 人们多在其培养基中添加生长因

子, 最常用的是血管内皮细胞生长因子(VEGF)。VEGF是一种特异性作用于血管内皮细胞的有丝分裂原<sup>[2]</sup>, 主要有4种亚型, 在人类细胞中其氨基酸残基数为121、165、189及206<sup>[3]</sup>。其中人VEGF

\* [基金项目] 国家自然科学基金(90208026)。

[作者简介] 李红华(1968-), 女(汉族), 博士生

\*Corresponding author. E-mail: houqiliu@hotmail.com

(hVEGF)<sub>189</sub>和 hVEGF<sub>206</sub>几乎完全被束缚在细胞外基质中, hVEGF<sub>121</sub>可自由扩散, hVEGF<sub>165</sub>结合力介乎两者之间。因此 hVEGF<sub>121</sub>、hVEGF<sub>165</sub>较易至靶细胞<sup>[4]</sup>, 人们将这 2 种基因重组进真核表达载体, 体内转染, 通过其旁分泌作用达到促血管生成效应<sup>[5~9]</sup>; 或体外转染真核细胞, 获得含具生物活性的 hVEGF 蛋白质的条件培养基, 促进 HUVEC 的体外增殖<sup>[10, 11]</sup>。实验证明, 外源基因表达的 hVEGF<sub>121</sub>、hVEGF<sub>165</sub>蛋白在体内外有相似的生物学效应<sup>[7, 10]</sup>。王国斌等<sup>[12]</sup>将 hVEGF<sub>165</sub>基因直接转染进 HUVEC, 通过旁分泌作用促进其生长, 获得良好效果。本实验拟构建 hVEGF<sub>121</sub> 亚型真核表达质粒, 将之转染 HUVEC, 观察转染对内皮细胞增殖的影响, 为 HUVEC 的体外培养探索一个可能的新方法。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料及仪器 pDNA 3 质粒和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本教研室保存; Total RNA Isolation Classic Kit, 3S Plasmid Miniprep Kit Ver 3.1, 3S DNA Gel Purification Kit Ver 3.1 (上海申能博彩生物科技有限公司); RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1, T4 DNA 连接酶 (大连宝生物工程有限公司); 限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* I (Fementas, MBI); FuGENE 6 脂质体 (Roche); hVEGF ELISA 试剂盒 (晶美生物工程有限公司)。

1.2 pDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> 真核表达质粒的构建 用 Total RNA Isolation Classic Kit 从人胚胎成纤维细胞中抽提总 RNA。由上海生工生物工程技术有限公司合成上、下游引物: P<sub>1</sub>: 5' cca agc tta cca tga act ttc tgc tgt ctt g 3'; P<sub>2</sub>: 5' cgg aat tca aac cct gag gga ggc tc 3'。P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 5' 端已分别引入了 *Hind* III 和 *EcoR* I 酶切位点。引物扩增的目的片段为 GenBank 核酸序列数据库 hVEGF<sub>121</sub> mRNA 序列 (accession No: E15157) 碱基 1 036~ 1 516, 包含整个 hVEGF<sub>121</sub> 前体 (由 26 个氨基酸的信号肽和 121 个氨基酸的 hVEGF<sub>121</sub> 组成) 蛋白质编码区。用 RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1, 以总 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应。电泳回收 497 bp DNA 片段。用限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切 pDNA 3 载体质粒和 hVEGF<sub>121</sub> cDNA。电泳回收后, 用 T4 DNA 连接酶重组连接, 构建成 pDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> 真核表达质粒, 酶切鉴定。由上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.3 HUVEC 基因转染 将原代 HUVEC (分离自多条新鲜脐带, 混合, 以减少个体差异对实验结果的

影响) 以每孔  $4 \times 10^4$  个细胞的密度接种至 24 孔板中, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24 h 后细胞达 40%~60% 汇合, 换液, 每孔 0.5 ml。下述质粒 DNA 和脂质体用量适用于转染 5 孔细胞, 具体实验中根据需要孔数做相应调整。取 6  $\mu$ l FuGENE 6 脂质体溶于 94  $\mu$ l 无血清 DMEM 培养液中, 轻弹混匀; 再加 1  $\mu$ g 重组质粒轻弹混匀; 室温静置 30 min; 加入 24 孔板中, 每孔 20  $\mu$ l, 旋动混匀; 同时设转染 pDNA 3 空质粒孔和不转染任何 DNA 孔做为对照。CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h 后换液, 每孔 0.5 ml, 此时记为 0 d。

1.4 各组细胞 hVEGF 蛋白分泌量的时间变化曲线 转染后 0~7 d 同一时间点重组质粒转染组和 2 个对照组各 3 孔用于下述实验, 其余各孔彻底换液, 每孔 0.5 ml。每组各 3 孔取尽培养液, 分别合并至 3 个 1.5 ml Eppendorf 管中, 5 000 r/min 离心 3 min, 留上清液, -20 保存, 待做 ELISA 检测 (检测当日各组培养液中 hVEGF 蛋白浓度, 单位  $\mu$ g/ml, 设为 A); 然后, 每孔加 0.25 ml 0.25% 胰蛋白酶消化, 加 0.25 ml 含血清培养液终止消化, 吹打成单细胞悬液, 血细胞计数板计数, 每孔计数 3 次, 最后取 3 孔的平均值作为当日该组的细胞数 (设为 B)。A  $\times$  0.5  $\times$  10<sup>4</sup>/B, 即得到各组当日每 10<sup>4</sup> 个细胞分泌 hVEGF 蛋白的量 ( $\mu$ g)。

1.5 各组细胞生长曲线 同前转染细胞, CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h 后换液, 每孔 0.5 ml, 记时 (此时记为 0 d)。以后, 分别于转染后 3 d 和 7 d 换液, 每孔更换原液量的 1/2。于转染后 0~7 d 同一时间点重组质粒转染组和 2 个对照组各 3 孔, 细胞计数, 方法同 1.4。各组当日细胞数以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验。在转染 3 d 和 7 d 后, 换液前, 每组各 3 孔, 每孔取 0.25 ml 培养液分别合并至 3 个 1.5 ml Eppendorf 管中, 待做 ELISA 检测。

1.6 ELISA 法测定 hVEGF 蛋白浓度 用于 ELISA 检测的培养液在取样后立即 5 000 r/min 离心 3 min, 留上清, -20 保存。待全部样品取齐后, 用 hVEGF ELISA 试剂盒和酶联免疫检测仪进行 ELISA 检测。用新鲜培养液做标准品和实验样品的稀释液; 标准品和实验样品均做双复孔测定, 所得值取均数 (具体方法参照说明书)。

## 2 结果

从人胚胎成纤维细胞总 RNA 中以 RT-PCR 法获得 hVEGF<sub>121</sub> cDNA。电泳显示, RT-PCR 产物中含两种 DNA 片段, 其中较短 DNA 片段与预期扩增

片段长度(497 bp)相符, 应是我们的目的片段(图略)。胶回收纯化该片段, 将其重组进 pDNA 3 质粒。用所得重组质粒转化大肠杆菌 DH 5 $\alpha$ , 得到 20~30 个转化子克隆。

选择 3 个分散良好的克隆, 编号为 1#、2# 和 3#, 将其质粒用上述 2 种限制性内切酶做双酶切鉴定, 电泳显示 3 个克隆所含质粒均被切成两个片段,

```
ccaagcttaccatgaactttctgctgtcttgggtgcattggagccttgccttgcctctctacccaccatgccaagtgggtccaggtg
caccctggcagaaggaggaggcagaatcatcacgaagtggtaagtcatggatgtctatcagcgcagctactgcatcacaac
gagaccctgggtgacatottccaggagtaccctgatgagatcgagtcacatcttcaagccatcctgtgtgcccctgatgcatgagg
ggctgtgcaatgaagaggcctggaggtgtgcccactgaggagtcacacacacacatgagattatgaggatcaaacctcaca
aggccagcacataggagagatgagcttctacagcacaacaatgtgaatgcagaccacaagaagatagagcaagacaagaaaa
atgtgacaagccgagccggtgagccggcaggaggaaaggcctcctcagggtttgaattccg
```

图 1 hVEGF<sub>121</sub> cDNA 测序结果

Fig 1 Sequencing result of hVEGF<sub>121</sub> cDNA

—: *Hind* III and *EcoR* I recognizing sites; atg: Start codon; tga: Stop codon;  
...: Signal peptide coding region; ==: hVEGF<sub>121</sub> protein coding region

重组质粒转染组 HUVEC 的 hVEGF 蛋白分泌量随时间变化情况: 转染 1 d 后即达峰值(每天 59.95 pg/10<sup>4</sup> 个细胞), 之后先快后慢下降, 转染 7 d 后仍高于 2 个对照组。2 个对照组情况相似, 维持低水平分泌(未转染组: 转染 1 d 后, 每天 0.56 pg/10<sup>4</sup> 个细胞; 转染 7 d 后, 每天 3.08 pg/10<sup>4</sup> 个细胞)。

鉴于上述重组质粒转染细胞 hVEGF 蛋白分泌量随时间的变化规律, 为保证培养上清中维持较高水平的 hVEGF 蛋白含量, 我们减少换液频率, 分别于转染 3 d 和 7 d 后换液, 且仅更换原液量的 1/2。结果发现, 重组质粒转染组细胞生长速度明显加快(图 2), 转染 3 d 后细胞数即与 2 个对照组有显著差异( $P < 0.01$ ); 细胞倍增时间缩短为 3 d 左右, 于转染 7 d 后达单层汇合。2 个对照组的细胞生长情况相似, 生长速度极为缓慢, 几乎停滞, 细胞倍增时间超过 7 d。此外, 重组质粒转染组细胞形态一直为椭圆形, 向四周生长增殖, 直至单层汇合; 而 2 个对照组细胞于转染后 3~4 d 即开始变成扁平多角形, 最后形成相互孤立的细胞岛(图 3)。ELISA 法测定重组质粒转染组培养上清中 hVEGF 含量在转染 3 d 和 7 d 后分别达 1429.16、1210.46 pg/ml, 约为未转染组(分别为 67.98、121.76 pg/ml)的 21 倍和 10 倍, 空质粒转染组(分别为 65.79、117.83 pg/ml)与未转染组相似。

分别与预期 DNA 片段(497 bp)及 pDNA 3 质粒(约 5400 bp)等长(图略)。

2# 克隆质粒的测序结果与目的序列 100% 相符, 插入序列长 497 bp(图 1), 插入方向正确, 因此可以判定 2# 克隆中质粒为成功构建的 pDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> 重组质粒。

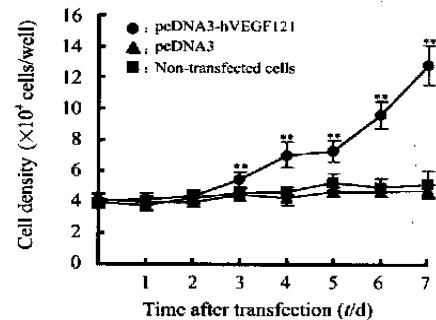


图 2 细胞生长曲线

Fig 2 Cell growth curves

\* \*  $P < 0.01$  vs pcDNA3 group or non-transfected cells group

### 3 讨论

我们将 hVEGF<sub>121</sub> 基因重组进真核表达载体 pDNA 3, 测序结果表明, 重组质粒中插入的基因序列与 GenBank 核酸序列数据库中的目的序列完全一致, 包含上述蛋白质编码区全长, 且插入方向正确。

我们采用真核表达质粒 pDNA 3 做为表达载体。HUVEC 在正常生理状态下低水平表达 VEGF, 具有正确加工与修饰 hVEGF<sub>121</sub> 前体蛋白的微环境, 可以保证正确构建的重组质粒表达具天然结构和活性的 hVEGF<sub>121</sub> 蛋白。实验结果说明我们构建的

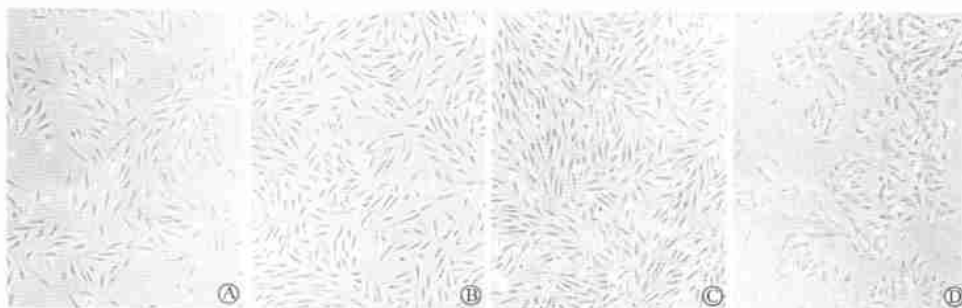


图 3 相差显微镜下观察转染细胞

Fig 3 Transfected cells under phase-contrast microscope (10 × 20)

A, B, C: HUVEC 0, 3 and 7 d after pcDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> transfection, respectively;

D: Non-transfected HUVEC on d 7; pcDNA 3 transfected cells were similar to non-transfected ones

pcDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> 重组质粒可以在 HUVEC 中高效表达, 且可以分泌到胞外, 发挥其促血管内皮细胞增殖的生物学效应。

脂质体转染有转染效率低、外源基因短期表达的缺点。但有研究表明, 如果表达产物是分泌性蛋白, 则少数转染细胞表达的产物也可以通过旁分泌效应在局部发挥生物学效应<sup>[10, 12]</sup>。我们在实验中发现, 尽管转染细胞 hVEGF 蛋白分泌量于转染 1 d 后即开始逐渐下降, 但至转染 7 d 后仍较对照组高出近 1 倍。另外, 我们根据其瞬时高表达的特点, 采取适当的细胞换液方式(每周 2 次, 每次换去原液量的 1/2), 在转染 7 d 后培养上清中 hVEGF 蛋白浓度仍能保持较高水平, 约为对照组的 10 倍。

综上所述, 我们成功构建了 pcDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> 真核表达质粒, 该质粒能在 HUVEC 中表达有生物活性的 hVEGF<sub>121</sub> 蛋白, 通过旁分泌作用明显促进 HUVEC 的体外增殖; 此外, pcDNA 3-hVEGF<sub>121</sub> 真核表达质粒还可以应用于体内转染促血管生成 hVEGF<sub>121</sub> 亚型生物学特性等研究领域。

### [参考文献]

- Zilla P, von Oppell U, Deutsch M. The endothelium: a key to the future[J]. *J Card Surg*, 1993, 8(1): 32-60
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1306-1309.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(18): 11947-11954
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669-676
- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb[J]. *Lancet*, 1996, 348(9024): 370-374
- Asahara T, Chen DH, Tsurumi Y, et al. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF<sub>165</sub> gene transfer[J]. *Circulation*, 1996, 94: 3291-3302
- Cherng JM, Lin CM, Lin CL, et al. Effects of VEGF121 and/or VEGF165 gene transfection on collateral circulation development[J]. *J Formos Med Assoc*, 2000, 99(8): 603-611.
- Wang H, Gordon D, Olszewski B, et al. Rat sponge implant model: a new system for evaluating angiogenic gene transfer[J]. *Int J Mol Med*, 2000, 6(6): 645-653
- Kondo Y, Arii S, Mori A, et al. Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(2): 622-630
- Dulak J, Jozkowicz A, Ratajska A, et al. Vascular endothelial growth factor is efficiently synthesized in spite of low transfection efficiency of pSG5VEGF plasmids in vascular smooth muscle cells[J]. *Vasc Med*, 2000, 5(1): 33-40
- 曾际斌, 洪敏, 周家文. 血管内皮生长因子在哺乳动物细胞中的表达[J]. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(3): 165-168
- Zeng JB, Hong M, Zhou JW. Expression of VEGF165 in mammalian cells[J]. *Zhongguo Mianyixue Zazhi (Chin J Immunol)*, 2002, 18(3): 165-168
- 王国斌, 王继亮. 血管内皮生长因子基因体外转染人脐静脉内皮细胞的实验研究[J]. *同济医科大学学报*, 2001, 30(6): 553-555.
- Wang GB, Wang JL. Experimental study on the expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells transfected with VEGF gene *in vitro*[J]. *Tongji Yike Daxue Xuebao (Acta Univ Med Tongji)*, 2001, 30(6): 553-555.

[收稿日期] 2004-03-05

[修回日期] 2004-07-07

[本文编辑] 尹 茶